

PTO 04-3807

German Patent No. 30 47 784 A1
(Offenlegungsschrift)

**PROCESS AND DEVICE FOR HEATING SUSPENSIONS OR SOLUTIONS THAT HAVE
BEEN FROZEN IN A FLAT PLASTIC POUCH**

Anonymity requested for inventors

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
WASHINGTON, D.C. JUNE 2004
TRANSLATED BY THE RALPH MCELROY TRANSLATION COMPANY

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY
 GERMAN PATENT OFFICE
 PATENT NO. 30 47 784 A1
 (Offenlegungsschrift)

Int. Cl.³:

C 12 N	5/00
A 01 N	1/02
A 61 K	36/14
B 01 L	7/00

Filing No.:

P 30 47 784.0-41

Filing Date:

December 18, 1980

Date Laid-open to public inspection:

July 1, 1982

**PROCESS AND DEVICE FOR HEATING SUSPENSIONS OR SOLUTIONS THAT HAVE
 BEEN FROZEN IN A FLAT PLASTIC POUCH**

[Verfahren und Vorrichtung zum Erwärmen von in einem flachen Kunststoffbeutel eingefrorenen
 Suspensionen oder Lösungen]

Inventors:

Anonymity requested

Applicant:

Forschungsgesellschaft für
 Biomedizinische Technik

A request for examination has been filed in accordance with § 44 of the Law on Patents

Claims

/1*

1. Process for heating aqueous suspensions or solutions of a living cell substance (frozen material) that have been frozen in a flat plastic pouch,

characterized by the feature

a) that the plastic pouch with the frozen material is placed between two heating plates that are capable of being driven apart from one another, whereby the frozen material is heated to a preselected temperature by these heating plates after they have been pressed together,

* [Numbers in the right margin indicate pagination of the original foreign text.]

b) that, as a result of swiveling movements of the heating plates that are brought about at the same time as the heating process, convection, which increases the transfer of heat at the time of melting, is imparted to the frozen material,

c) and finally that, when the melted frozen material has reached the preselected temperature, the plastic pouch with the melted frozen material is removed from its location between the heating plates that have then been driven apart from one another once again.

2. Device for carrying out the process in accordance with Claim 1,
characterized by the feature

that the device comprises two heating plates (2a, 2b) that are selectively capable of being driven toward one another and that serve for accommodating a plastic pouch (1) that contains a frozen material, whereby the temperature to which the heating plates are heated is capable of being preselected, and whereby the heating plates are supported by a holding element (14) that is movable above a fixed base plate (15), and whereby the holding element is capable of being swiveled in a rhythmically elliptical manner by means of a swiveling device (6, 7).

3. Device in accordance with Claim 2,
characterized by the feature

that measurement devices (20, 21, 22) are provided on the device, whereby, during the heating process, these measurement devices determine the surface temperature both at the heating plates (2a, 2b) and also externally on the plastic pouch (1).

4. Device in accordance with Claim 3,
characterized by the feature

that, in order to measure the surface temperature of the plastic pouch, surface sensors are led through one heating plate (2a), whereby these sensors press on the surface of the plastic pouch (1) in a spring mounted manner.

5. Device in accordance with Claim 3,
characterized by the feature

that mechanically operating probes (22) are provided that press, in an elastic manner, onto the plastic pouch (1) that contains the frozen material and they trigger a signal when the frozen material has melted completely.

6. Device in accordance with Claim 3,
characterized by the feature

that measurement devices are provided that initiate the driving apart of the two heating plates and the hoisting up of the [previously] frozen material from the lower heating plate (2b) upon reaching the preselected temperature.

7. Device in accordance with Claim 3,
characterized by the feature

that each heating plate comprises a thermally and electrically insulating plastic sheet (19) to which a heating strip conductor plate (18) has been adhesively attached, whereby a thin heating conductor plate (17) is first applied to this heating strip conductor plate and then a copper sheet (16) is applied to the heating strip conductor plate.

The invention pertains to a process and devices for heating suspensions or solutions of a living cell substance, such as e.g. units of stored human blood, that have been frozen in a flat plastic pouch, whereby these are termed the frozen material in the following sections. /4

In the case of one such known process, it is usual to use larger units with a mass of approximately 50 - 500 g and to use thin slab-shaped samples, which have a layer thickness of approximately 5 - 10 mm, for the efficient utilization of deep frozen living blood cells or for the efficient provision of cryoglobulins. In the case of using such slabs, a uniform rate of change of temperature, i.e. change of temperature with time, can be obtained within limits of approximately 10% for virtually the entire mass of the sample with the exception of the edge zone. The solutions that are being spoken of here are usually introduced into a plastic pouch, and then heat sealed and frozen in a slab-shaped holder in a way that is known as such.

The heating process should be of the same order of magnitude as the freezing process in terms of the rate of change of temperature; however distinctly more rapid heating than corresponds to the rate of cooling should be striven for. As a result of this, the situation can be prevented in which devitrification occurs and hence, in the case of cells, intracellular ice is formed, for example. In order that a temperature gradient between the ice block, which is located in the geometric center of the slab, and the heated outer zone should not occur during the heating process, whereby such a temperature gradient would exert an unfavorable influence, forced convection is imparted, via shaking, to the medium in the interior of the pouch in the case of the known process. As a result of this, the transfer of heat to the melting ice is increased on the one hand and, on the other hand, one avoids the overheating of small portions of the aqueous solution that are in the vicinity of the walls [of the container]. /5

The following procedural steps have been adopted in the past for heating the sample:

- introducing the slab-shaped sample, which has been frozen into a pouch, into a water bath at e.g. 40 °C;
- maintaining the slab shape of the melting sample during the process by means of special holders or containers;
- moving the sample in the longitudinal direction at a frequency of approximately 4 Hz and an amplitude of approximately 8 cm;
- removing the pouch from the water bath after a predetermined time that is known from experimental findings;
- if the sample has thawed out completely, then the pouch is dried off and forwarded for /6

further use.

The disadvantages of this known type of heating process are the following:

1. The dwell time that is required in the water bath for thawing out purposes is highly dependent on the mass of the sample. Even small mass variations, which are common in practice, around a measured average value have led, as a consequence, to the situation in which the desired temperature of the sample after thawing out, e.g. 4°C, is significantly exceeded or fallen short of. In addition, incomplete melting of the ice in the sample can frequently be ascertained, whereby this can lead, as a consequence, to serious losses in terms of the quality of the material.

2. The operating procedure can take place only with specially trained and qualified personnel since the positioning of the slab shaped sample, which has been frozen in a pouch, has to be carried out as rapidly as possible at the time of immersion in the water bath because the thawing process sets in with full effect straight away at this moment in time. The liquid that is then produced in the sample deforms the sample in the case of deficient positional fixing. Rapid positioning is also of importance since forced convection in the sample has to set in at the beginning of the formation of liquid.

3. A special holder or container, which keeps the sample in the shape of a slab, is required throughout the duration of the heating process. This circumstance requires either storing the sample in appropriate containers, whereby this increases considerably the cost per sample, or introducing the sample into a container or holder in an intensely cold atmosphere, whereby this is associated with known difficulties (icing up, undesired heating of the sample, danger of freezing the hands of the personnel), especially in the case of storage in liquid nitrogen which is common in the medicinal sector.

4. The required drying off of the sample brings about an additional loss of time and operating expense. Drying off is absolutely necessary because subsequent sterile handling is usually to be expected; water residues on the corresponding inlet or outlet connectors make sterility impossible.

The problem that therefore forms the basis of the invention is to avoid the disadvantages of the known process, and to create a process that makes it possible to heat aqueous suspensions or solutions that have been frozen in a flat plastic pouch in a simple but safe manner. This problem is solved in accordance with the invention by the process that is characterized in the patent claims.

This process is carried out in the following manner: the slab shaped samples, which have each been frozen in a pouch, are heated, via thermal conduction, with the help of electrical heat. In order to do this, the samples are introduced between two metal plates that are heated by means of an electric current. The surface temperature T_{OH} of these heating plates is adjusted to a prescribed value that can be in the region of 40 °C or higher. T_{OH} is maintained at this value with the help of a suitable regulating system that is known as such, whereby a maximal deviation in the

region of 1°C from the set average temperature value is permitted. During the heating up process, the surface temperature T_{OB} is also measured externally on the plastic pouch, whereby this surface temperature is used as an indicator of the temperature T_I in the pouch. In order to do this, one merely needs to know the thermal properties of the plastic foil that forms the pouch in each case from which the temperature difference between T_I and T_{OB} can be computed via the laws of heat transfer; the difference is of the order of 5°C. The surface temperature T_{OB} of the pouch is also prescribed and is used for terminating the heating up process: the heating plates are removed from the sample as soon as T_{OB} is reached. In addition, forced convection is imparted to the frozen material during the heating process, whereby this is carried out by providing the entire "heating plate/frozen material" system with appropriate relative movement. In order to increase the heat transfer coefficients at the "ice-like/liquid" phase boundary in the partially thawed out material, special movement is imparted in such a way that streaming of the liquid takes place, e.g. primarily parallel to the ice front. In order to do this, the frozen material / heating plate system is moved e.g. elliptically. The frequency of this movement is in the 1 - 10/s range, and the amplitude is 5 - 20 cm.

The advantages of this process are numerous and are of decisive importance for the goal that is being striven for, namely an improvement in quality and the reproducibility of such quality. It meets the requirements in terms of a defined temperature in the material that has been heated up, and in terms of safety in handling, and in terms of its independence of the exact mass of the frozen material.

A technical embodiment can be carried out in e.g. the following manner.

The plastic pouch with the frozen material 1 (Figs. 1, 4, 5) is placed between the heating plates 2a, 2b that are positioned apart from one another. As a result, a contact [switch] is closed via a photoelectric barrier or mechanically and, as a result of this, the servomotor 3 drives the heating plates together via the pinion gear 4 and the toothed rod 5. The heating plate is pressed in a defined manner onto the plastic pouch by springs 5b that act in the stroke direction. A joint 5a at the end of the toothed rod permits the adaptation of the heating plate's bearing surface to the frozen material, which is not exactly plane parallel, whereby this joint is constructed in the form of a connection between the toothed rod and the heating plate. The swiveling motor 6 then sets the holding element 14 in motion via a rotary disk and a connecting rod 7 or planet wheel 7b and sun wheel 7a; as a result of this, forced convection in the way described above is produced in the frozen material at the start of melting; the holding element 14 is hereby moved relative to the base plate 15. The heating plates are simultaneously heated to the selected temperature T_{OH} . With the help of thermal sensors 9, 10 and mechanical probes 11 within the heating plates 2a and 2b, the temperatures of the heating plates T_{OH} [and] of the frozen material on the outside of the foil pouch T_{OB} and the ongoing melting of the ice are ascertained during the process via the

mechanical probes in conjunction with a length measuring device. The thermo-elements are assembled from copper/constantan bimetallic strips. Sensors 20 for the measurement of T_{OH} are soldered into the copper sheets 16 (Fig. 2); in order to measure T_{OB} , surface sensors 21 are led through the heating plates onto the plastic pouch and press, in a spring mounted manner, onto the measurement locations in order to permit an essentially falsification-free measurement of T_{OB} . The mechanically acting probe 22 is also led in a springy manner onto the frozen material so that, with increasing melting, it penetrates into the solution that has already become liquid. If ice is no longer present, the probe makes measurements throughout the full depth of the frozen material and actuates an acoustic and optical display in order to signal the end of the melting process. The heating up process can then be terminated as a result of this. If the preselected temperature T_{OB} has been reached as an indicator of the temperature of the frozen material, then the hoisting motor 3 is actuated, and the plates are driven apart, and the frozen material is simultaneously hoisted up from the lower heating plate via a basket 23 that is driven upward, whereby this is done in order to rule out any after-heating effect on the pouch after switching off the heating plate. The swivel motor 6 is then switched off, and the sample is made available for further processing.

In order to avoid local overheating, the heating plates are assembled in the following manner (Fig. 2): the heating conductor plate 18 is adhesively attached to a thermally and electrically insulating plastic sheet 19. A thin heating conductor plate 17 is applied above this. Contact with the frozen material is made via the copper sheet 16 whose extremely high thermal conductivity nullifies local differences in heat transfer without any disadvantageous local increases in temperature.

The course of regulation within the collaboration of the mechanical elements and of the regulating system can be seen from the flow diagram in Fig. 3.

The advantages of the process in accordance with the invention are as follows when applied to frozen aqueous solutions that are to be heated.

1. The process is independent of the mass of the sample since regulated heating and regulated termination of the entire heating up process take place.

/11

2. A temperature can be specified for the material in question, whereby termination of the thawing out process is possible upon reaching this temperature. In many cases, it is precisely this temperature that is of decisive importance for subsequent further processing of the material in terms of high quality as is known in e.g. the case of concentrates of living cells.
3. Defined forced convection is produced in the sample; the temperature field that consequently arises in the sample is homogeneous in the desired manner, so that harmful devitrification or recrystallization, and the damage to the cell membranes that is associated therewith, can be avoided with certainty.

4. There are benefits in terms of costs, time, and safety since a special container is not required that would otherwise have to maintain the slab shape of the frozen material during the heating up process.

5. Inserting the pouch plus the frozen solution into the heating apparatus is possible within an extremely short period of time; as a result of this, the period of undefined heating in the ambient atmosphere, via contact with the air, is so short that no loss in quality is produced.

6. It is possible for auxiliary personnel to carry out the heating process, whereby this is increasingly decisive in regard to the feasibility of the entire process because of the increasing shortage of personnel in the technical medicinal sector.

/12

7. An automated, defined heating process becomes possible as a result of regulating and ascertaining the temperature of the material in question and of the heating plates.

8. Drying off of the sample is unnecessary, and hence there is a lower risk of bacterial contamination.

Because of these advantages, the heating process is especially suitable for sensitive biological cell concentrates and for the process of preparing a cryoprecipitate from blood plasma or blood serum. For example, concentrates of frozen human bone marrow cells with a mass of 150 g are heated from -196 ° to + 4 °C in 60 s using this process, whereby the external heat transfer coefficient is in the 200 - 600 W/square m K range, and a power output of 4 kW is delivered. An analogous procedure is followed with human lymphocytes, thrombocytes, and erythrocytes.

The previous practice of heating with use being made of the water bath technique that has been described is suitable only to a limited extent for wide scale application and for maintaining the desired quality of the substances under consideration. Both factors are taken into account with the process in accordance with the invention. If one considers the economic importance of providing cryoglobulins and the increasing tendency of clinics to store and administer cell concentrates of units of stored blood separately per cell fraction, then far reaching significance can be ascribed to the advance that can be achieved with the process in accordance with the invention.

Summarizing, reference is also made to the following point: the long-term conservation of aqueous suspensions of biological cells via low temperature processes has achieved a permanent position today, especially within the medicinal sector. Here, it is not only the use of deep frozen red blood corpuscles that can be mentioned, whose stock-keeping and inventorying are carried out for the most widely differing reasons such as use in operations, accidents, and catastrophes, but mention can also be made of the recent, promising and completely novel applications that arise via self donation, i.e. donation comprising stored units of blood for oneself. Thus tumor therapy can be improved decisively by bone marrow cells, red lymphocytes, and

/13

peripheral blood stem cells. An even greater demand for frozen units of blood platelets, the thrombocytes, is looming on the horizon via frozen units of stored blood of adequate quality.

An economically possibly still more significant area of application of low temperature processes involving the use of aqueous solutions or suspensions is the provision of cryoglobulins from blood plasma, i.e. the cell-free liquid of the blood, for the efficient provision of plasma protein fractions that are needed for immunological forms of therapy or for preventive treatment.

An essential criterion for the usability of frozen cell concentrates and cryoglobulins, which have been provided by low temperature treatment, is the quality that is obtained at the end of the process. The factors that are to be optimized in order to obtain the highest possible yield of living cells or purified globulins have become increasingly well known over the last few years. An aspect that emerges from this, in particular, is that one finds a strict dependence on the

/14

- a) rate of cooling and on the
- b) rate of heating

of the frozen material. Additional factors are involved such as, to mention only the most important, the following: the process for the mixing in of solutions to the liquid material and of agents that affect the freezing characteristics of the material, such as e.g. antifreeze agents, as well as the concentration and packing of the cells or globulins. However, parameters a) and b) have a decisive effect on the starting quality of the material that has been treated.

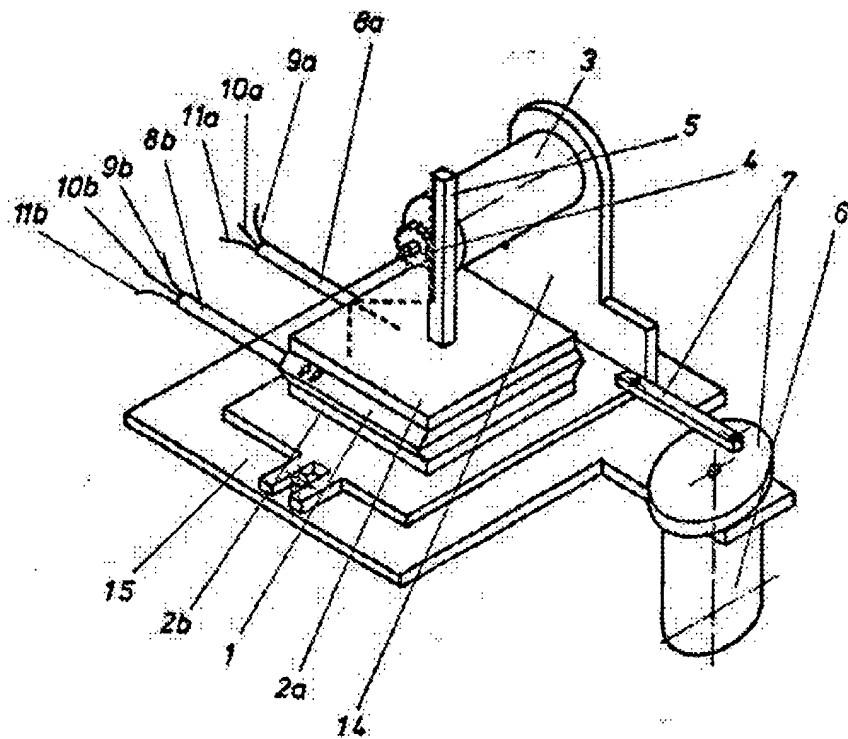


Figure 1

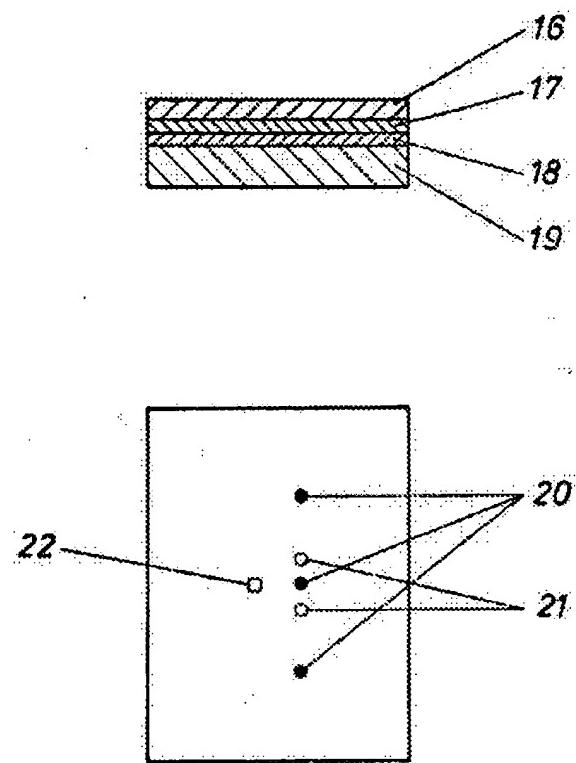


Figure 2

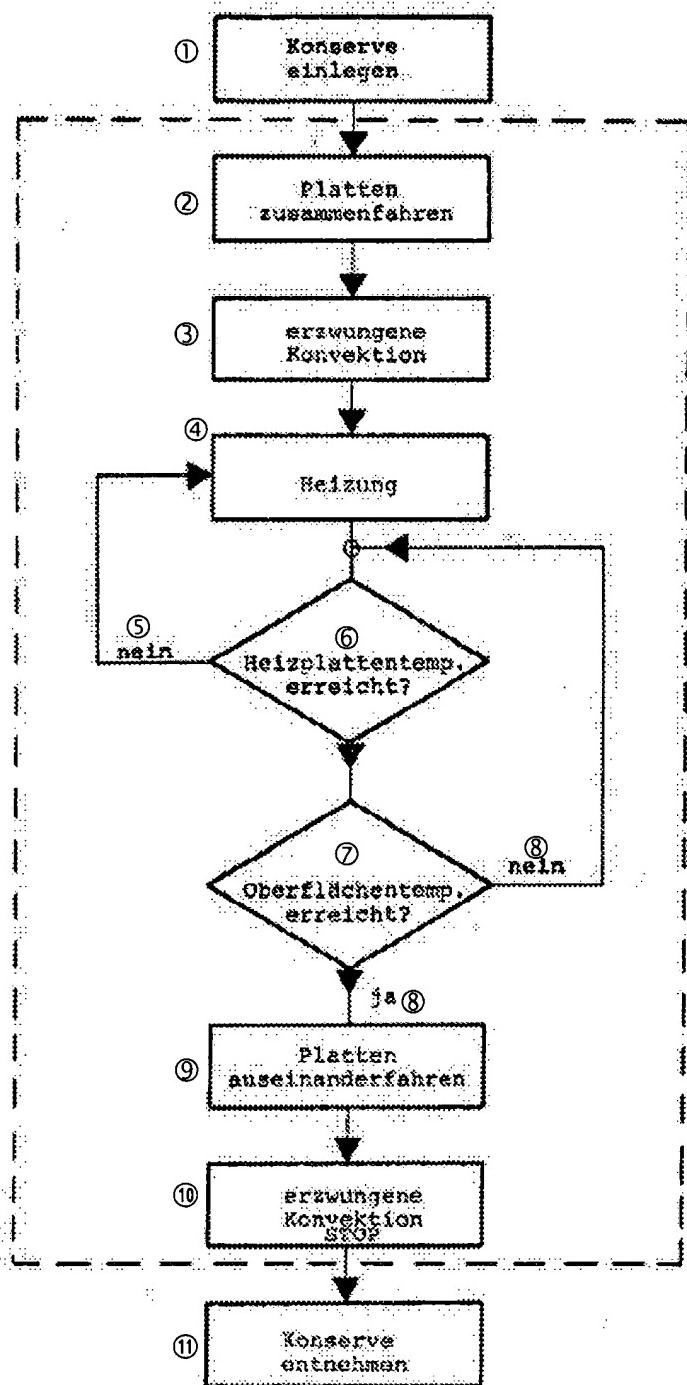


Figure 3

- Key:
- 1 Insert stored units of blood
 - 2 Drive the plates together
 - 3 Forced convection
 - 4 Heating
 - 5 No
 - 6 Heating plate temperature attained?

- 7 Surface temperature attained?
- 8 Yes
- 9 Drive the plates apart from one another
- 10 Forced convection
- STOP
- 11 Remove the stored units of blood

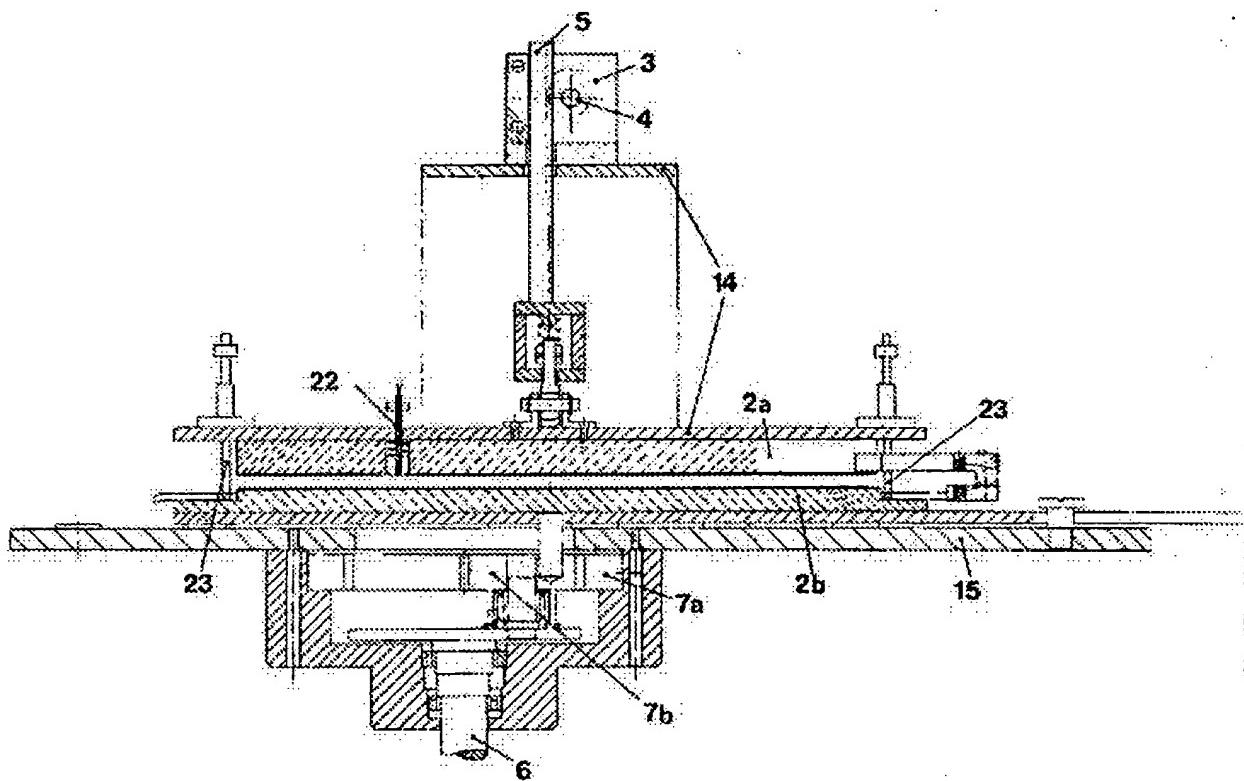


Figure 4

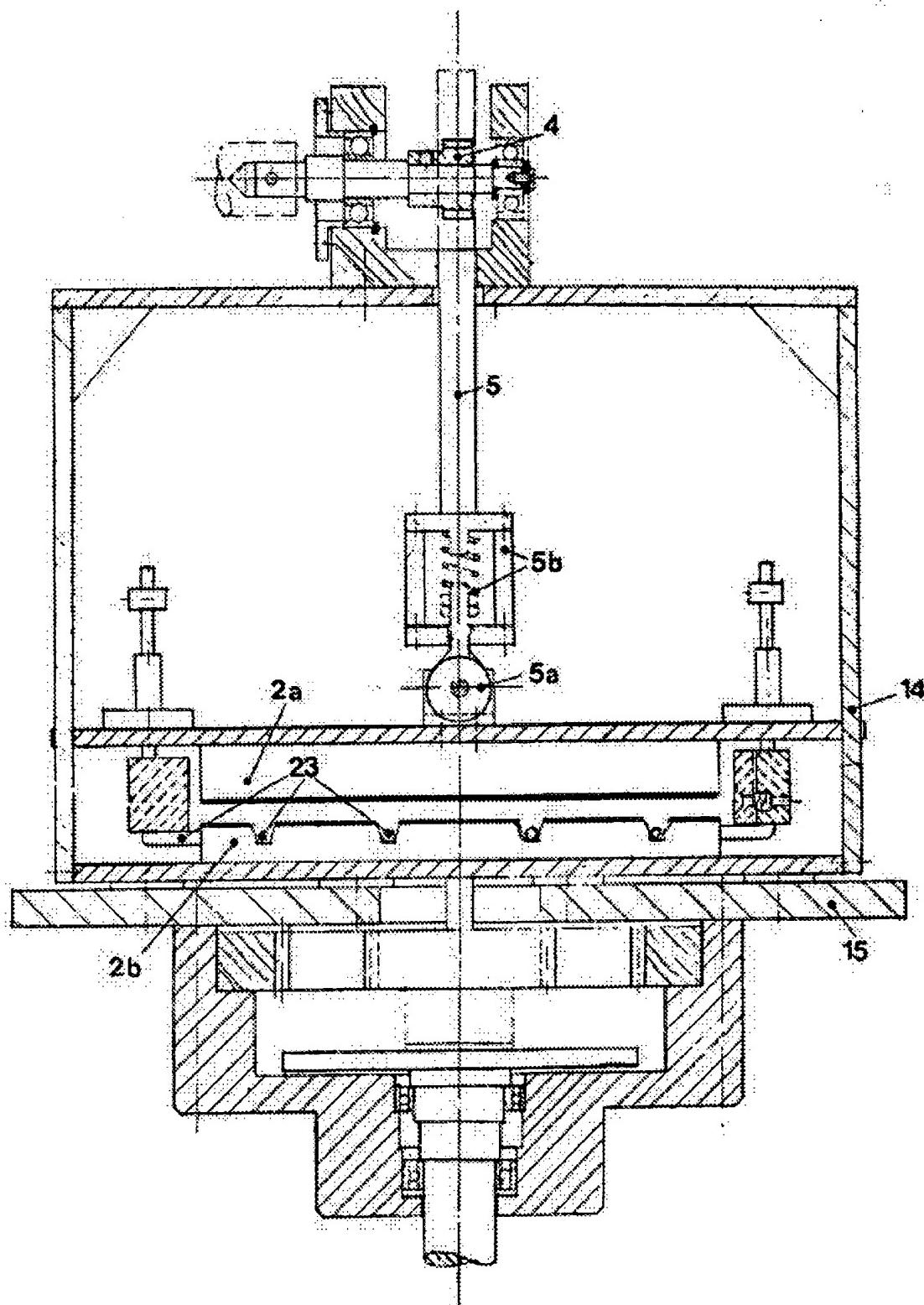


Figure 5

⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3047784 A1

⑬ Int. Cl. 3:

C 12 N 5/00

A 01 N 1/02

A 61 K 35/14

B 01 L 7/00

⑯ Aktenzeichen:
⑰ Anmeldetag:
⑱ Offenlegungstag:

P 30 47 784.0-41

18. 12. 80

1. 7. 82

Deutscheneigentum

① Anmelder:

Forschungsgesellschaft für Biomedizinische Technik, 5100
Aachen, DE

② Erfinder:

Antrag auf Nichtnennung

DE 3047784 A1

Attached
USP 4,473,739, which
council opines in page 7, last ¶
Paper No. 12 is equivalent
to DE 30 47784

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

④ Verfahren und Vorrichtung zum Erwärmen von in einem flachen Kunststoffbeutel eingefrorenen Suspensionen oder Lösungen

DE 3047784 A1

18.10.80

3047784

Forschungsgesellschaft für
Biomedizinische Technik
Goethestraße 27/29
5100 Aachen

80/13829-Hf

Patentansprüche :

1. Verfahren zum Erwärmen von in einem flachen Kunststoffbeutel eingefrorenen wässrigen Suspensionen oder Lösungen von lebender Zellsubstanz (Gefriergut),
5 dadurch gekennzeichnet,
 - a) daß der Kunststoffbeutel mit dem Gefriergut zwischen zwei auseinanderfahrbare Heizplatten gelegt wird, durch die nach deren Zusammendrücken das Gefriergut auf eine vorgewählte Temperatur erwärmt wird,
 - b) daß durch gleichzeitig mit dem Erwärmen bewirkte Schwenkbewegungen der Heizplatten dem Gefriergut eine den Wärmeübergang beim Schmelzen erhöhende Konvektion aufgeprägt wird,
 - c) und daß schließlich die Kunststoffbeutel mit dem geschmolzenen Gefriergut, wenn dieses die vorge-
10 wählt Temperatur erreicht hat, zwischen den dann wieder auseinandergefahrenen Heizplatten entnommen wird.
- 20 2. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Patentanspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Vorrichtung aus zwei wahlweise gegeneinander bewegbaren, zur Aufnahme eines Gefriergut enthaltenden
25 Kunststoffbeutels (1) dienenden Heizplatten (2a, 2b)
besteht, deren Heiztemperatur vorwählbar ist und die von einem über einer feststehenden Grundplatte (15)
bewegbaren Halteelement (14) getragen werden, das
durch eine Schwenkvorrichtung (6, 7) rhythmisch ellip-
30 senförmig schwenkbar ist.

ORIGINAL INSPECTED

18.12.80

3047784

- 2 -

- 1 3. Vorrichtung nach Patentanspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß an der Vorrichtung Meßeinrichtungen (20, 21,
22) vorgesehen sind, die während des Erwärmungs-
5 prozesses die Oberflächentemperatur sowohl an den
Heizplatten (2a, 2b) als auch außen an dem Kunst-
stoffbeutel (1) ermitteln.
- 10 4. Vorrichtung nach Patentanspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß zur Messung der Oberflächentemperatur des
Kunststoffbeutels durch die eine Heizplatte (2a)
Oberflächenfühler hindurchgeführt sind, die fe-
dernd gelagert auf die Oberfläche des Kunststoff-
15 beutels (1) drücken.
- 20 5. Vorrichtung nach Patentanspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß mechanisch wirkende Taster (22) vorgesehen
sind, die federnd auf den das Gefriergut enthal-
tenden Kunststoffbeutel (1) drücken und ein Sig-
nal auslösen, wenn das Gefriergut vollständig ge-
schmolzen ist.
- 25 6. Vorrichtung nach Patentanspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß Meßeinrichtungen vorgesehen sind, die bei
Erreichen der vorgewählten Temperatur das Ausei-
nanderfahren der beiden Heizplatten und das Ab-
30 heben des Gefriergutes von der unteren Heizplatte
(2b) veranlassen.

18.12.80

3047784

- 3 -

1 7. Vorrichtung nach Patentanspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß jede Heizplatte aus einer thermisch und
elektrisch isolierenden Kunststoffplatte (19)
5 besteht, auf die eine Heizleiterbahnpappe ^{Latte} (18)
aufgeklebt ist, auf der zunächst eine dünne
Heizleiterpappe ^{Latte} (17) und dann noch eine Kupfer-
platte (16) aufgebracht ist.

10

15

20

25

30

35

18.12.80

4.

3047784

Forschungsgesellschaft für
Biomedizinische Technik
Goethestraße 27/29

80/13829-Hf

5100 Aachen

Verfahren und Vorrichtung zum Erwärmen von
in einem flachen Kunststoffbeutel eingefrorenen
Suspensionen oder Lösungen.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und Vorrichtungen zum Erwärmen von in einem flachen Kunststoffbeutel eingefrorenen Suspensionen oder Lösungen von lebender Zellsubstanz, wie z.B. menschliche Blutkonserven, die nachstehend als Gefriergut bezeichnet sind.

Bei einem bekannten derartigen Verfahren ist für die rationelle Anwendung von tiefgefrorenen, lebenden Blutzellen bzw. für die rationelle Erstellung von Kryoglobulinen die Verwendung größerer Einheiten von ca. 50 - 500 g Masse und die Verwendung dünner plattenförmiger Proben üblich, die eine Schichtdicke von ca. 5 - 10 mm aufweisen. Bei Verwendung solcher Platten kann eine einheitliche Temperaturänderungsrate, d.h. Temperaturänderung mit der Zeit, in den Grenzen von ca. 10 % für nahezu die gesamte Probenmasse, außer der Randzone, erhalten werden. Üblicherweise werden die Lösungen, von denen hier die Rede ist, in einen Kunststoffbeutel gefüllt, verschweißt und in an sich bekannter Weise in einem plattenförmigen Halter gefroren.

18.10.80

3047784

- 3 - 5 .

- 1 Der Erwärmungsprozeß sollte von der Temperaturänderungsgeschwindigkeit her in der gleichen Größenordnung wie der Frierprozeß liegen, anzustreben ist jedoch eine deutlich raschere Erwärmung
- 5 als der Kühlrate entspricht. Dadurch kann verhindert werden, daß eine Devitrifizierung und damit bei Zellen, z.B. intrazelluläres Eis, auftritt. Damit während des Erwärmungsvorganges kein sich ungünstig auswirkender Temperaturgradient zwischen
- 10 dem in der geometrischen Mitte der Platte befindlichen Eisblock und der erwärmten Außenzone auftritt, wird bei dem bekannten Verfahren dem Medium im Inneren des Beutels durch Schütteln eine erzwungene Konvektion aufgeprägt. Dadurch wird einerseits der Wärmeübergang an das schmelzende Eis erhöht, andererseits eine Überhitzung wandnaher Teilchen der wässrigen Lösung vermieden.

Bisher wird zum Erwärmen der Probe wie folgt verfahren:

- 20
- Einbringen der plattenförmig in einen Beutel eingefrorenen Probe in ein Wasserbad von z.B. 40°C;
- 25
- Aufrechterhalten der Plattenform der schmelzenden Probe während des Prozesses durch spezielle Halter bzw. Container;
- 30
- Bewegen der Probe mit einer Frequenz von etwa 4 Hz bei einer Amplitude von ca. 8 cm in longitudinaler Richtung;
- 35
- Nach Erreichen einer aus experimentellen Befunden bekannten vorgegebenen Zeit Entnahme der Beutel aus dem Wasserbad;

10.10.80

- 3/- 6.

3047784

- 1 - Der Beutel wird, falls die Probe vollständig aufgetaut ist, abgetrocknet und der weiteren Verwendung zugeführt.
- 5 Die Nachteile dieser bekannten Art von Erwärmungsverfahren sind folgende :
 1. Die zum Auftauen erforderliche Verweilzeit im Wasserbad hängt stark von der Masse der Probe ab.
10 Schon geringe, in der Praxis übliche Schwankungen der Masse um einen festgestellten Mittelwert haben zur Folge, daß die nach dem Tauen gewünschte Temperatur der Probe, z.B. +4°C, bedeutend über- oder unterschritten wird. Auch ist häufig eine
15 nicht vollständige Abschmelzung des Eises in der Probe festzustellen, was für die Qualität des Materials empfindliche Einbußen zur Folge haben kann.
 2. Die Bedienung kann nur durch speziell geschultes, qualifiziertes Personal erfolgen, da die Positionierung der plattenförmig in einem Beutel eingefrorenen Probe beim Eintauchen in das Wasserbad so schnell wie möglich vorgenommen werden muß, weil
20 der Tauprozess in diesem Moment bereits mit voller Wirkung einsetzt. Die dann entstehende Flüssigkeit in der Probe deformiert die Probe bei mangelnder Fixierung. Die rasche Positionierung ist auch von
25 Bedeutung, da mit Beginn der Flüssigkeitsbildung bereits die erzwungene Konvektion in der Probe einsetzen muß.
30
 3. Ein spezieller Halter oder Container, der die Probe in der Plattenform hält, ist für die Dauer des Erwärmungsprozesses erforderlich. Dieser Umstand erfordert entweder bereits das Lagern der Probe in
35

18.12.80

3047784

- 4 -

- 1 entsprechenden Containern, was den Aufwand je Probe beträchtlich erhöht, oder das Einbringen der Probe in einen Container oder Halter erst in der tiefkalten Atmosphäre, was mit den bekannten Schwierigkeiten (Vereisung, ungewollte Erwärmung der Probe, Erfrierungsgefahr für die Hände des Personals), insbesondere bei der im medizinischen Bereich üblichen Lagerung in Flüssigstickstoff, verbunden ist.
- 10 4. Die erforderliche Abtrocknung der Probe bringt zusätzlichen Zeitverlust und Arbeitsaufwand. Die Abtrocknung ist unbedingt erforderlich, weil üblicherweise nachfolgende sterile Handhabung vorauszusetzen ist; Wasserreste an entsprechenden Ein- oder Auslaßstutzen machen die Sterilität zunichte.
- 15

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die Nachteile des bekannten Verfahrens zu vermeiden und ein Verfahren zu schaffen, das das Erwärmen von in einem flachen Kunststoffbeutel eingefrorenen wässrigen Suspensionen oder Lösungen in einfacher, aber doch sicherer Weise ermöglicht. Diese Aufgabe ist gemäß der Erfindung durch das in dem Patentanspruch gekennzeichnete Verfahren gelöst.

- 20
- 25 Dieses Verfahren wird in folgender Weise durchgeführt: die plattenförmig je in einem Beutel eingefrorenen Proben werden mit Hilfe elektrischer Wärme durch Wärmeleitung aufgewärmt. Dazu werden die Proben zwischen zwei Metallplatten eingebracht, die durch elektrischen Strom beheizt werden. Die Oberflächentemperatur T_{OH} dieser Heizplatten wird auf einen vorgebbaren Wert eingestellt, der im Bereich von $40^{\circ}C$ oder höher liegen kann. T_{OH} wird mit Hilfe einer geeigneten, an sich bekannten Regelung auf diesem Wert gehalten, wobei eine maximale Abweichung im Bereich von $1^{\circ}C$ vom eingestell-
- 30
- 35

- 1 ten mittleren Temperaturwert zugelassen wird. Während des Aufwärmprozesses wird weiterhin die Oberflächentemperatur T_{OB} außen am Kunststoffbeutel gemessen, die als Indikator für die Temperatur T_I im Beutel verwendet wird. Dazu ist lediglich die Kenntnis der thermischen Eigenschaften der jeweils den Beutel bildenden Kunststoff-Folie notwendig, woraus die Temperaturdifferenz zwischen T_I und T_{OB} mit den Gesetzen der Wärmeübertragung berechnet werden kann; die Differenz liegt
- 5 in der Größenordnung von 5°C. Die Beutel-Oberflächentemperatur T_{OB} wird ebenfalls vorgegeben und für die Beendigung des Aufheizvorganges verwendet: sobald T_{OB} erreicht ist, werden die Heizplatten von der Probe entfernt. Zusätzlich wird dem Gefriergut während des Er-
- 10 wärmungsprozesses eine erzwungene Konvektion aufgeprägt, indem das gesamte System "Heizplatte / Gefriergut" mit einer entsprechenden Relativbewegung versehen wird. Zur Erhöhung des Wärmeübergangskoeffizienten an der Phasengrenze "eisförmig - flüssig" im teilweise aufge-
- 15 tauten Material wird eine spezielle Bewegung in der Weise aufgeprägt, daß eine Strömung der Flüssigkeit, z.B. vornehmlich parallel zur Eisfront erfolgt. Dazu wird das System Gefriergut - Heizplatte z.B. ellipsenförmig bewegt. Die Bewegungsfrequenz liegt im Bereich
- 20 1 - 10/s, die Auslenkung bei 5 - 20 cm.
- 25

Die Vorteile dieses Verfahrens sind vielfältig und für das angestrebte Ziel der Qualitätsverbesserung und Qualitätsreproduzierbarkeit von ausschlaggebender Bedeutung. Es erfüllt die Forderungen nach definierter Temperatur im aufgewärmten Gut, nach Sicherheit in der Handhabung und nach Unabhängigkeit von der genauen Masse des Gefriergutes.

16.12.80

3047784

- 6 - 9

- 1 Eine technische Ausgestaltung kann z.B. in folgender Weise vorgenommen werden:
Der Kunststoffbeutel mit dem gefrorenen Gut 1 (Abb. 1, 4, 5) wird zwischen die auseinander gestellten Heizplatten 2a, 2b gelegt. Dadurch wird ein Kontakt durch eine Lichtschranke oder mechanisch geschlossen, wodurch der Stellmotor 3 über Ritzel 4 und Zahnstange 5 die Heizplatten zusammenfährt. Durch in Richtung des Hubes wirkende Federn 5b wird die Heizplatte definiert auf
- 10 den Kunststoffbeutel gepreßt. Ein Gelenk 5a am Ende der Zahnstange, als Verbindung zwischen Zahnstange und Heizplatte ausgebildet, ermöglicht die Anpassung der Heizplattenauflagefläche an nicht exakt planparalleles Gefriergut. Anschließend setzt der Schwenkmotor 6 über
- 15 Drehscheibe und Kurbelstange 7 bzw. Planetenrad 7b und Sonnenrad 7a das Halteelement 14 in Bewegung, wodurch in dem Gefriergut zu Beginn des Schmelzens eine erzwungene Konvektion in der vorstehend beschriebenen Weise erzeugt wird; dabei bewegt sich Haltelement 14
- 20 relativ zur Grundplatte 15. Gleichzeitig werden die Heizplatten auf die gewählte Temperatur T_{OH} erwärmt. Während des Prozesses werden in den Heizplatten 2a und 2b mit Hilfe von Thermofühlern 9, 10 und mechanischen Tastern 11 die Temperaturen der Heizplatten T_{OH} des
- 25 Gefriergutes außen am Folienbeutel T_{OB} und das fortlaufende Schmelzen des Eises durch den mechanischen Taster in Verbindung mit einer Längenmeßeinrichtung erfaßt. Die Thermoelemente sind aus Kupferkonstantan-Paarungen erstellt. In den Kupferplatten 16 (Abb. 2)
- 30 sind Fühler zur Messung von T_{OH} 20 eingelötet; zur Messung von T_{OB} sind Oberflächenfühler 21 durch die Heizplatte auf den Kunststoffbeutel durchgeführt und drücken federnd gelagert auf die Meßstellen, um eine weitgehend verfälschungsfreie Messung von T_{OB} zu ermöglichen. Der mechanisch wirkende Taster 22 ist eben-

18.10.80

3047784

- 7-10.

- 1 falls federnd auf das Gefriergut geführt, so daß er mit zunehmendem Schmelzen tiefer in die bereits flüssige Lösung eindringt. Ist kein Eis mehr vorhanden, durchmisst der Taster die volle Tiefe des Gefriergutes
- 5 und betätigt eine akustische und optische Anzeige zum Hinweis auf das Ende des Schmelzprozesses. Der Aufwärmvorgang kann dadurch jetzt schon beendet werden. Ist die vorgewählte Temperatur T_{OB} als Indikator für die Gefrierguttemperatur erreicht, werden der Hubmotor
- 10 tor 3 betätigt, die Platten auseinandergefahren und das Gefriergut gleichzeitig mit einem hochgefahrenen Korb 23 von der unteren Heizplatte abgehoben, um nach erfolgter Abschaltung der Heizplatte einen Nachheizeffekt auf den Beutel auszuschalten. Dann wird der
- 15 Schwenkmotor 6 abgeschaltet und die Probe ist zur Weiterverarbeitung bereitgestellt.

Die Heizplatten sind zur Vermeidung örtlicher Überhitzungen in folgender Weise aufgebaut (Abb. 2) :

- 20 auf eine thermisch und elektrisch isolierende Kunststoffplatte 19 ist die Heizleiterplatte 18 aufgeklebt. Darüber ist eine dünne Heizleiterplatte 17 aufgebracht. Der Kontakt zum Gefriergut wird mit der Kupferplatte 16 hergestellt; durch deren extrem hohe Wärmeleitfähigkeit werden örtliche Wärmeübergangsunterschiede ohne nachteilige örtliche Temperaturerhöhungen ausgeglichen.
- 25

- Der Regelungsablauf innerhalb des Zusammenwirkens der mechanischen Elemente und des Regelsystems ist dem
- 30 Flußdiagramm Abb. 3 zu entnehmen.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens in der Anwendung auf zu erwärmende gefrorene wässrige Lösungen sind :

18.10.80

3047784

- 8 - 11.

- 1 1. Unabhängigkeit des Prozesses von der Probenmasse, da eine geregelte Beheizung und eine geregelte Beendigung des Gesamtaufwärmprozesses erfolgt.
- 5 2. Vorgabe einer Guttemperatur und bei Erreichen dieser Temperatur ist die Beendigung des Auftauvorganges möglich. Gerade diese Temperatur ist für die sich anschließende Weiterverarbeitung des Materials in vielen Fällen von entscheidender Bedeutung für die gute Qualität, wie z.B. für den Fall von Konzentraten lebender Blutzellen bekannt ist.
- 10 3. Definierte erzwungene Konvektion in der Probe; das sich dadurch ergebende Temperaturfeld in der Probe ist in gewünschter Weise homogen, so daß die schädigende Devitrifizierung oder Rekristallisation mit Sicherheit vermieden werden kann, sowie die damit verbundene Schädigung der Zellmembranen.
- 15 4. Kosten-, Zeit- und Sicherheitsgewinn, da kein spezieller Container erforderlich ist, der sonst dem Gefriergut die Plattenform während des Aufwärmprozesses erhalten muß.
- 20 5. Einlegen des Beutels mit der gefrorenen Lösung in die Aufwärmapparatur innerhalb kürzester Zeit möglich; dadurch wird die Zeit des undefinierten Erwärmens in der Umgebungsatmosphäre durch den Kontakt zur Luft so kurz, daß keine Qualitätseinbuße entsteht.
- 25 6. Durchführung des Erwärmungsprozesses durch Hilfskräfte möglich, was in Hinsicht auf größer werdende Personalknappheit im medizinisch-technischen

18.12.80

3047784

- 9/ - 12 .

1 Bereich immer ausschlaggebender für die Durchführbarkeit des Gesamtverfahrens ist.

5 7. Automatisierter, definierter Erwärmungsprozeß durch Regelung und Erfassung der Gut- und Heizplattentemperatur.

8. Kein Abtrocknen der Probe erforderlich und damit geringere Gefahr der bakteriellen Kontamination.

10

Aufgrund dieser Vorzüge ist das Erwärmungsverfahren besonders geeignet für empfindliche biologische Zellkonzentrate und für den Herstellungsprozeß von Kryopräzipitat aus Blutplasma oder Blutserum. Beispiels-

15 15 weise werden Konzentrate gefrorener menschlicher Knochenmarkzellen mit der Masse 150 g mit diesem Verfahren in 60 s von -196° auf +4°C erwärmt, wobei der äußere Wärmeübergangskoeffizient im Bereich von 200 - 600 W/qm K liegt und eine Heizleistung von 4 kW auf-
20 gebracht wird. Analog wird mit menschlichen Lymphozyten, Thrombozyten und Erythrozyten verfahren.

Die bisherige Praxis des Erwärmens unter Verwendung der beschriebenen Wasserbadtechnik ist für eine weit-
25 verbreitete Anwendung und zum Erhalt der gewünschten Qualität der betrachteten Substanzen nur bedingt geeignet. Beiden Faktoren wird mit dem erfindungsgemäßigen Verfahren Rechnung getragen. Berücksichtigt man die wirtschaftliche Bedeutung der Erstellung der Kryoglobuline und die zunehmende Tendenz der Kliniken, Zellkonzentrate aus Blutkonserven pro Zellfraktion getrennt zu lagern und zu verabreichen, dann kann dem mit dem erfindungsgemäßigen Verfahren zu erzielenden Fortschritt eine weitreichende Bedeutung zugesessen werden.

- 10-13.

- 1 Zusammenfassend wird noch auf folgendes hingewiesen:
Die Langzeitkonservierung wäßriger Suspensionen von
biologischen Zellen durch Tieftemperatur-Verfahren
hat heute einen festen Platz, insbesondere innerhalb
5 des medizinischen Bereiches, inne. Hier ist nicht
nur die Verwendung tiefgefrorener roter Blutkörperchen
zu erwähnen, deren Lagerhaltung und Bevorratung aus
verschiedensten Gründen, wie Einsatz bei Operationen,
Unfällen und Katastrophen, durchgeführt wird, sondern
10 in jüngster Zeit auch aussichtsreiche, völlig neuartige
Anwendungen, die sich durch die Eigenspende, d.h.
die Spende aus der Konserve, für sich selbst ergeben.
So kann die Tumortherapie durch Knochenmarkszellen roter
15 Lymphozyten und periphere Blutstammzellen entscheidend
verbessert werden. Ein noch größerer Bedarf an gefrorenen
Einheiten von Blutplättchen, den Thrombozyten,
zeichnet sich bei hinreichender Qualität der gefrorenen
Konserve ab .
- 20 Ein wirtschaftlich möglicherweise noch bedeutenderer Anwendungsbereich der Tieftemperatur-Verfahren in der Anwendung auf wäßrige Lösungen oder Suspensionen ist die Erstellung von Kryoglobulinen aus dem Blutplasma, d.h. der zellfreien Flüssigkeit des Blutes, zur rationellen
25 Erstellung von Plasmaeiweißfraktionen, die für immunologische Therapieformen oder zu vorbeugender Behandlung benötigt werden.
- 30 Wesentliches Kriterium der Anwendbarkeit sowohl gefrorener Zellkonzentrate wie durch Tieftemperaturbehandlung erstellter Kryoglobuline ist die bei Ende des Prozesses
erhaltene Qualität. In den letzten Jahren sind die Einflußgrößen, die es zum Erhalt einer möglichst hohen Ausbeute an lebenden Zellen bzw. purifizierten Globulinen
35 zu optimieren gilt, immer besser bekanntgeworden. Ins-

18.12.80

3047784

- 11 - M.

- 1 besondere kristallisiert sich heraus, daß eine strenge Abhängigkeit von der
 - a) Abkühlrate und der
 - b) Erwärmungsrate
- 5 des Gefriergutes vorhanden ist. Weitere Faktoren kommen hinzu, wie Zumischungsverfahren von Lösungen zum flüssigen Gut, von das Gefrierverhalten des Gutes beeinflussenden Agenzien, wie z.B. Gefrierschutzmittel und auch Konzentration und Packung der Zellen bzw. Globuline, um die
- 10 wichtigsten zu nennen. Entscheidenden Einfluß auf die Ausgangsqualität des behandelten Gutes haben jedoch die Parameter a) und b).

15

20

25

30

35

19.10.1

Nummer:

Int. Cl.³:

Anmeldetag:

Offenlegungstag:

3047784

C12N 5/00

18. Dezember 1980

1. Juli 1982

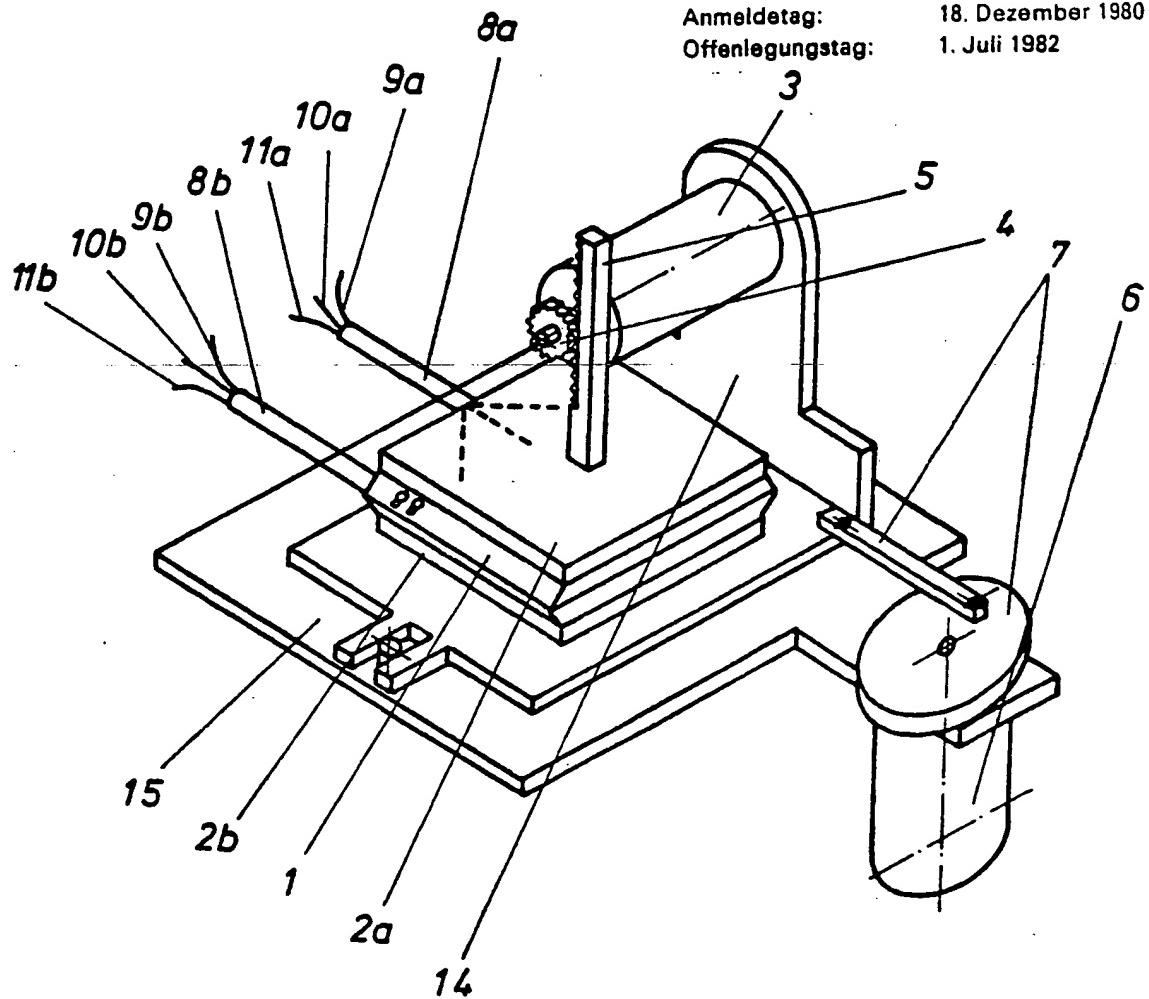


Abb. 1

15. 16. 12. 60

3047784

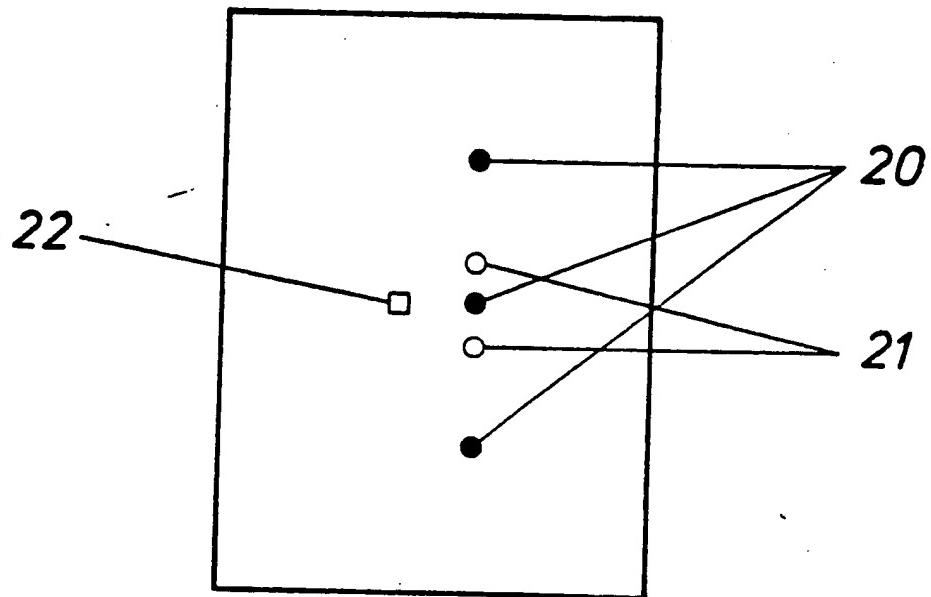
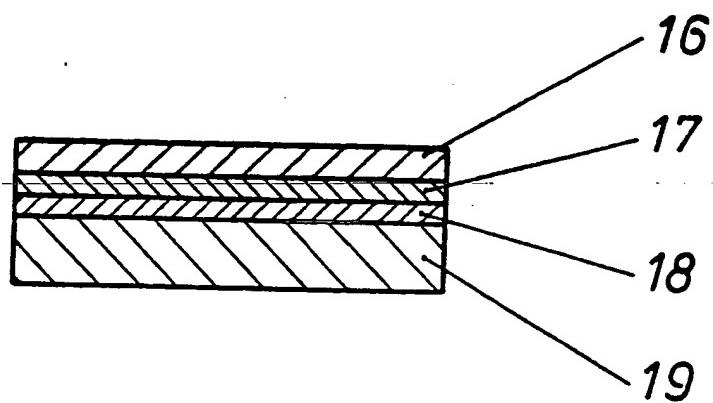


Abb. 2

16.

16.12.80

3047784

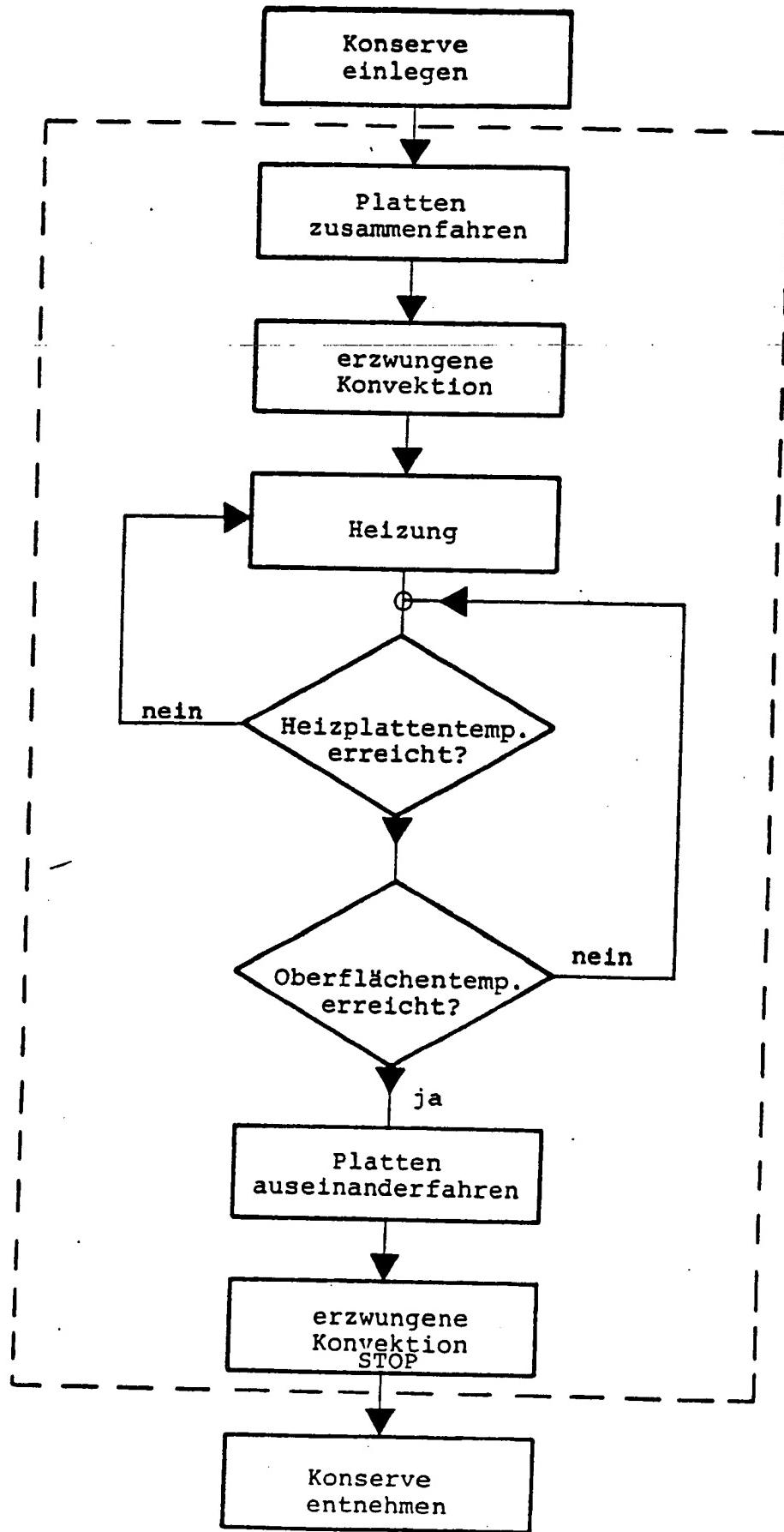


Abb. 3

17. 18. 12. 80

3047784

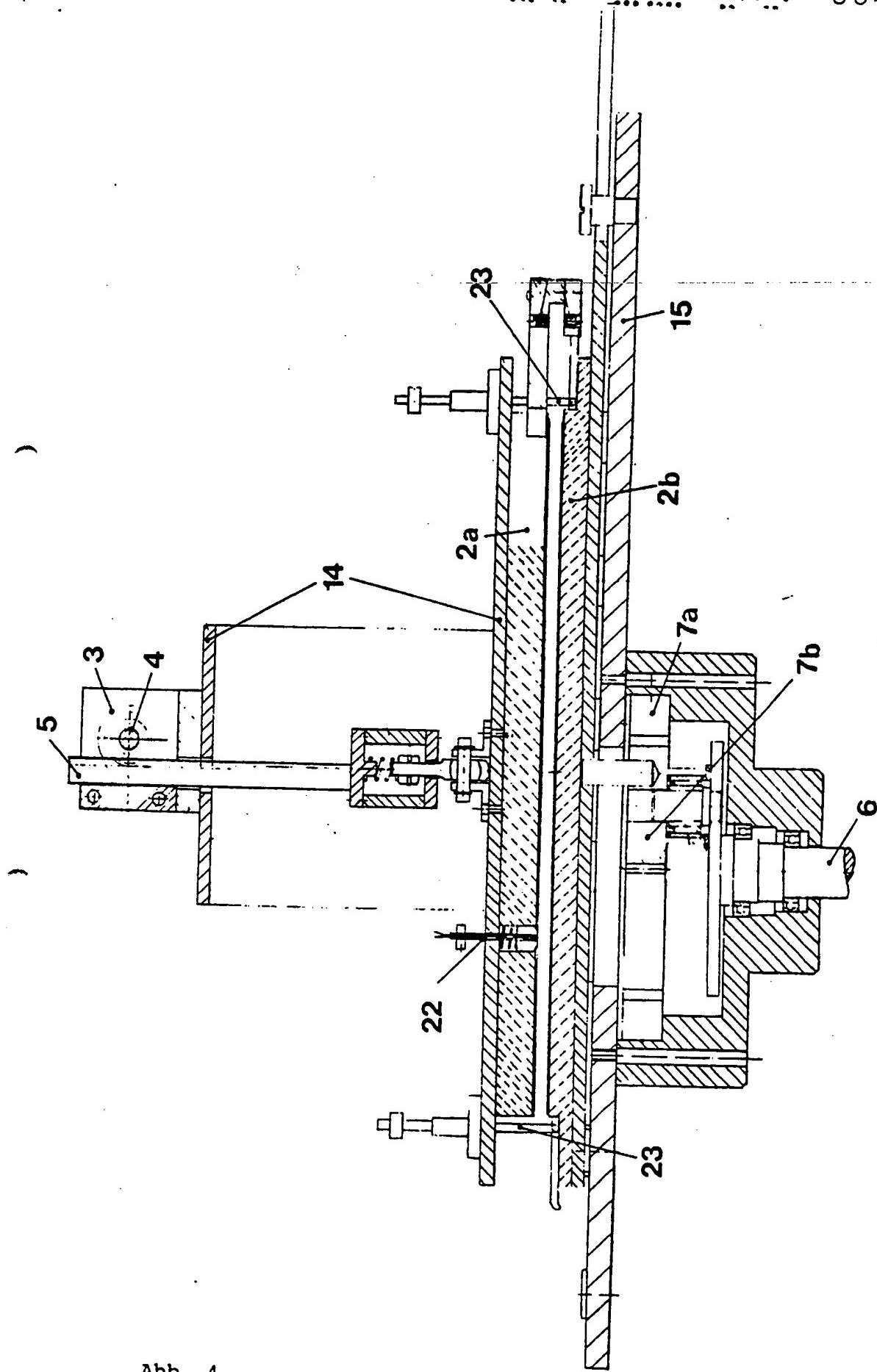


Abb. 4

18. 16.12.80 3047784

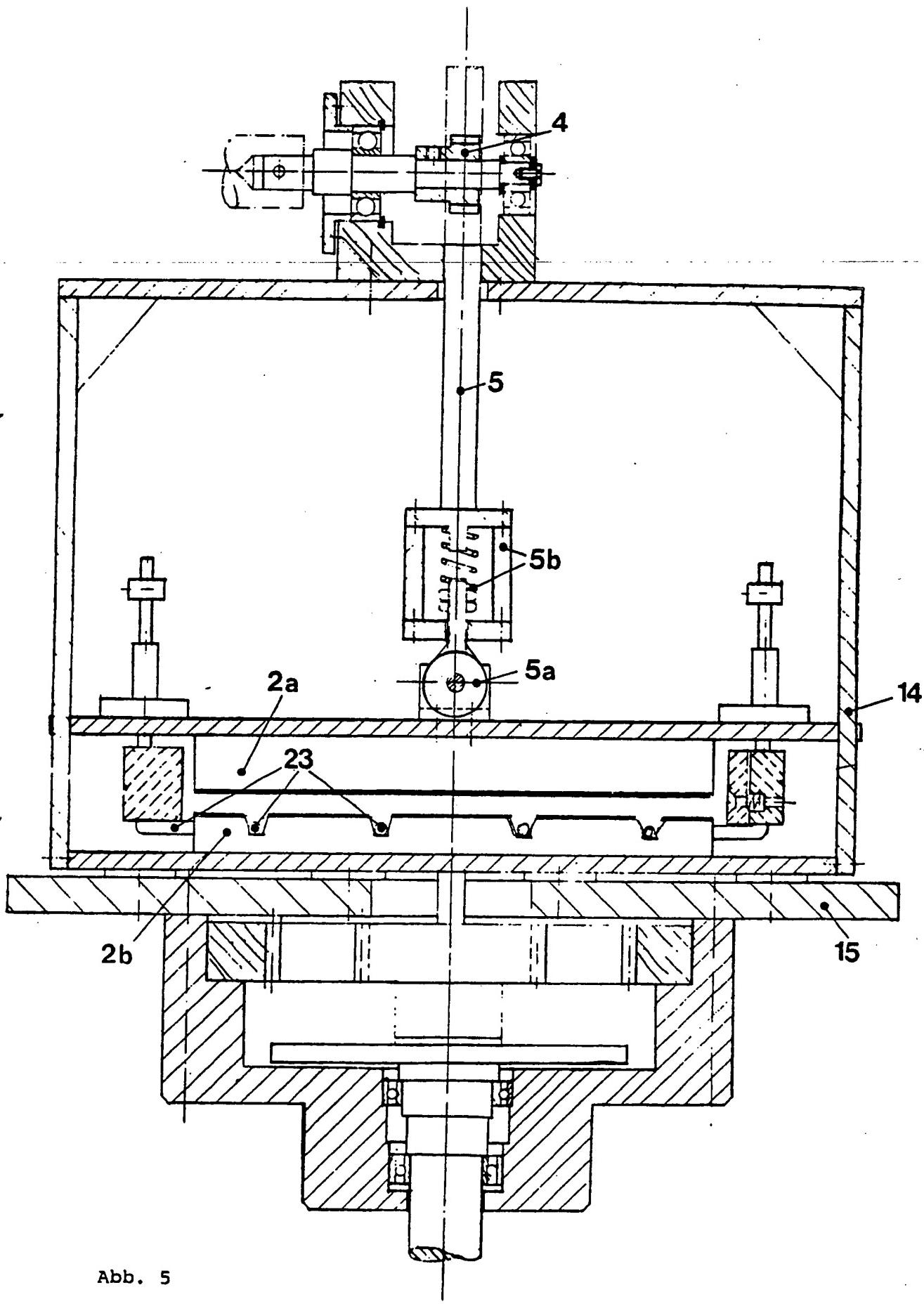


Abb. 5